



(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, 15/62, 15/63, C12P 21/02	A1	(11) 国際公開番号 WO97/03190 (43) 国際公開日 1997年1月30日(30.01.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/01899 (22) 国際出願日 1996年7月9日(09.07.96) (30) 優先権データ 特願平7/174778 1995年7月11日(11.07.95) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 財団法人 相模中央化学研究所 (SAGAMI CHEMICAL RESEARCH CENTER)[JP/JP] 〒229 神奈川県相模原市西大沼4丁目4番1号 Kanagawa, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 加藤誠志(KATO, Seishi)[JP/JP] 〒228 神奈川県相模原市南台1-9-2 Kanagawa, (JP) 山口知子(YAMAGUCHI, Tomoko)[JP/JP] 〒125 東京都葛飾区高砂5-13-11 Tokyo, (JP) 関根伸吾(SEKINE, Shingo)[JP/JP] 〒229 神奈川県相模原市西大沼4-4-1 Kanagawa, (JP) 鎌田貢壽(KAMATA, Kouju)[JP/JP] 〒228 神奈川県相模原市上鶴間5-17-8 Kanagawa, (JP)		(81) 指定国 JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: HUMAN GALECTIN-4-LIKE PROTEIN AND cDNA ENCODING THE SAME (54)発明の名称 ヒトガレクチン-4様蛋白質およびそれをコードするcDNA (57) Abstract A galectin-4 (a lactose-binding protein)-like protein expressed specifically in the stomach and intestines and a human cDNA encoding the same. The protein is one containing the amino acid sequence represented by SEQ ID NO: 1 while the gene is a cDNA containing the base sequence represented by SEQ ID NO: 2. The protein which is the expression product of this cDNA has a lactose-binding activity and is applicable to drugs and research reagents.		

(57) 要約

本発明は、胃腸に特異的に発現しているラクトース結合蛋白質ガレクチン-4様蛋白質およびそれをコードするヒトcDNAを提供する。本発明の蛋白質および遺伝子は、配列番号1で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質および配列番号2で表される塩基配列を含むcDNAであり、このヒトcDNAの発現産物である蛋白質はラクトース結合活性を示し、医薬や研究用試薬として利用できる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	DE	ドイツ	LI	リヒテンシュタイン	PL	ポーランド
AM	アルメニア	DK	デンマーク	LC	リヒテンシュタイン	PT	ポルトガル
AU	オーストラリア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AZ	アゼルバイジャン	ES	スペイン	LR	リベリア	SE	スウェーデン
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	FI	フィンランド	LS	レソト	SI	スロベニア
BB	バルバドス	FR	フランス	LT	リトアニア	SK	スロバキア
BE	ベルギー	GB	イギリス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GG	ガイアナ	LV	ラトヴィア	SS	スウェーデン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MC	モナコ	SN	セネガル
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MD	モルドヴァ共和国	ST	サントメ・プリンシペ
BY	ベラルーシ	GU	グアム	MG	マダガスカル	TG	トーゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MK	マケドニア共和国	TD	チャド
CC	中央アフリカ共和国	IL	イスラエル	ML	マリ	TJ	タジキスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MN	モンゴル	TM	トルクメニスタン
CH	スイス	JP	日本	MR	モーリタニア	TT	トリニダード・トバゴ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	MW	マラウイ	TA	タリ
CM	カメルーン	KR	韓国	MX	メキシコ	UG	ウガンダ
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NE	ニジェール	US	合衆国
CU	キューバ	KZ	カザフスタン	NL	オランダ	UZ	ウズベキスタン
CZ	チェコ共和国			NZ	ニュージーランド	VN	ベトナム

明 細 書

ヒトガレクチン-4様蛋白質およびそれをコードするcDNA

5

技術分野

本発明は、ヒト細胞内で発現しているmRNAに由来する新規cDNA、およびそれがコードするガレクチン-4様蛋白質に関する。本発明のヒトcDNAは、遺伝子診断用プローブや遺伝子治療用遺伝子源として用いることが出来る。また、該cDNAが

10 コードしている蛋白質を大量生産するための遺伝子源として用いることが出来る。本発明の蛋白質は、医薬や糖鎖研究のための試薬として用いることが出来る。

背景技術

ガレクチンはガラクトースと結合する動物レクチンの総称である。動物レクチンは細胞質、核、細胞膜表面など様々な部位に存在し、細胞増殖、分化、癌化、転移、免疫などに関与していると考えられている[Drickamer, K., Annu. Rev. Cell Biol., 9:237-264(1993)]。この中で、ガレクチン-4はラットの腸の抽出物中に多量に含まれているレクチンとして見いだされた。ガレクチン-4は、胃や腸などの消化管に特異的に発現し、粘膜に多量に存在していることから、これらの

15 器官の機能維持に不可欠な蛋白質であると考えられている。これまでにラットからガレクチン-4をコードするcDNAがクローン化されているが[Oda, Y. et al., J. Biol. Chem., 268:5929-5939(1993)]、ヒトガレクチン-4様蛋白質をコードするcDNAについての報告はない。

25 発明の開示

本発明者らは鋭意研究の結果、ガレクチン-4様蛋白質をコードするヒトcDNAをクローン化し、本発明を完成した。すなわち、本発明は、ガレクチン-4様蛋白質である、配列番号1で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質を提供する。また本発明は上記アミノ酸配列をコードするcDNA及び、その具体例としての配列番号

30 2又は3で表される塩基配列を含むcDNAを提供する。

本発明のヒトcDNAは、ヒト細胞由来cDNAライブラリーからクローン化することが出来る。このcDNAライブラリーはヒト細胞から抽出した ポリ(A)⁺RNAを鋳型として作製する。ヒト細胞としては、人体から手術などによって摘出されたものでも培養細胞でも良い。実施例では胃癌組織から単離したポリ(A)⁺RNAを用いた。c

5 DNAの合成にあたっては、岡山-Berg法[Okayama, H. and Berg, P., Mol. Cell. Biol., 2:161-170(1982)], Gubler-Hoffman法[Gubler, U. and Hoffman, J. Gene, 25:263-269(1983)]などいかなる方法を用いてもよいが、完全長クローンを効率的に 得るためには、実施例にあげたようなキャッピング法[Kato, S. et al., Gene, 150:243-250(1994)]を用いることが望ましい。cDNAの同定は、シーケンシングによる全塩基配列の決定、塩基配列から予測されるアミノ酸配列と類似配列を有する既知蛋白質の検索、インビトロ翻訳による蛋白質発現、大腸菌による発現、発現産物の活性測定によって行なう。活性測定は、ラクトースとの結合能を確認することによって行なう。

15 本発明のcDNAは、配列番号1で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列、例えば配列番号2で表される塩基配列を含むことを特徴とするものである。例えば、配列番号3で表されるものは、1113bpからなる塩基配列を有し、972bpのオープンリーディングフレームを有している。このオープンリーディングフレームは、323アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしている。この蛋白質はアミノ酸配列レベルでラットガレクチン-4と76.3%という高い類似性を有している。

20 なお、配列番号3に記載の、cDNAの塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドプローブを用いて、胃腸組織あるいは胃腸由来細胞株から作製したヒトcDNAライブラリーをスクリーニングすることにより、本発明のcDNAと同一のクローンを容易に得ることが出来る。

25 一般にヒト遺伝子は個体差による多型が頻繁に認められる。従って配列番号1で表されるアミノ酸配列をコードする塩基配列あるいは配列番号3において、1又は複数個のヌクレオチドの付加、欠失および/又は他のヌクレオチドによる置換がなされているcDNAも本発明の範疇にはいる。

30 同様に、これらの変更によって生じる、1又は複数個のアミノ酸の付加、欠失および/又は他のアミノ酸による置換がなされている蛋白質も、本発明の範疇に入る。

本発明のcDNAには、配列番号2あるいは3で表される塩基配列のいかなる部分塩基配列を含むcDNA断片(10bp以上)も含まれる。また、センス鎖およびアンチセンス鎖からなるDNA断片もこの範疇にはいる。これらのDNA断片は遺伝子診断用のプローブとして用いることができる。

- 5 本発明の蛋白質は、本発明のcDNAを有するベクターからインビトロ転写によってRNAを調製し、これを鋳型としてインビトロ翻訳を行なうことによりインビトロで発現出来る。また翻訳領域を公知の方法を用いて適当な発現ベクターに組換えることにより、大腸菌、枯草菌、酵母、動物細胞等で、コードしている蛋白質を大量に発現させることもできる。あるいは下記配列表に示すアミノ酸配列に基づき、化学合成によってペプチドを調製することも出来る。
- 10

本発明の蛋白質の範囲には、ラクトース結合活性を有するものであれば、他の任意の蛋白質との融合蛋白質も含まれる。例えば、実施例に挙げたマルトース結合蛋白質との融合蛋白質が例示できる。

15 図面の簡単な説明

図1は本発明のプラスミドpHP01049の構造を示す。

図2は本発明の大腸菌用発現ベクターpMKGAL4の構造を示す。

発明を実施するための最良の形態

- 20 次に実施例により発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。DNAの組換えに関する基本的な操作および酵素反応は、文献["Molecular Cloning. A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989]に従った。制限酵素および各種修飾酵素は、特に記載の無い場合、宝酒造社製のものを用いた。各酵素反応の緩衝液組成、並びに反応条件は付属の説明書
- 25 に従った。cDNA合成は文献[Kato, S. et al., Gene, 150:243-250(1994)]に従った。

実施例

ポリ(A)⁺RNAの調製

ヒト胃癌組織1gを5.5Mグアニジウムチオシアネート溶液20ml中でホモジナイズ
5 した後、文献[Okayama, H. et al., "Methods in Enzymology" Vol. 164, Academic
Press, 1987]に従い、750 μ gのmRNAを調製した。これを20mM トリス塩酸緩衝液(pH
7.6)、0.5M NaCl、1mM EDTAで洗浄したオリゴdTセルロースカラムにかけ、上掲
文献に従いポリ(A)⁺RNA 10 μ gを得た。

10 cDNAライブラリーの作製

上記ポリ(A)⁺RNA 10 μ gを100mM トリス塩酸緩衝液(pH 8)に溶解し、RNaseを含
まないバクテリア由来アルカリホスファターゼ 1単位を添加し、37°C1時間反応
させた。反応液をフェノール抽出後、エタノール沈殿を行ない、ペレットを50mM
酢酸ナトリウム(pH 6)、1mM EDTA、0.1% 2-メルカプトエタノール、0.01% Triton
15 X-100溶液に溶解した。これに、タバコ由来酸ピロホスファターゼ(エピセンター
テクノロジーズ社製)1単位を添加して、総量100 μ lで37°C1時間反応させた。反
応液をフェノール抽出後、エタノール沈殿を行ない、ペレットを水に溶解し、脱
キャップ処理したポリ(A)⁺RNA溶液を得た。

脱キャップ処理したポリ(A)⁺RNA、DNA-RNAキメラオリゴヌクレオチド
20 (5'-dG-dG-dG-dG-dA-dA-dT-dT-dC-dG-dA-G-G-A-3') 3nmolを50mM トリス塩酸緩衝
液(pH 7.5)、0.5mM ATP、5mM MgCl₂、10mM 2-メルカプトエタノール、25%ポリエ
チレングリコール水溶液に溶解し、T4RNAリガーゼ 50単位を添加し、総量30 μ l
で20°C12時間反応させた。反応液をフェノール抽出後、エタノール沈殿を行ない、
ペレットを水に溶解し、キメラオリゴキャップ付加ポリ(A)⁺RNAを得た。

25 本発明者らが開発したベクターpKA1(EP 426455-A)をKpnIで消化後、末端転移
酵素により約60個のdTテールを付加した。これをEcoRV消化して片側のdTテール
を除去したものをベクタープライマーとして用いた。

先に調製したキメラオリゴキャップ付加ポリ(A)⁺RNA 6 μ gを、ベクタープライ
マー 1.2 μ gとアニールさせた後、50mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.3)、75mM KCl、
30 3mM MgCl₂、10mM ジチオスレイトール、1.25mM dNTP(dATP+dCTP+dGTP+dTTP)溶液

に溶解し、逆転写酵素(GIBCO-BRL社製)200単位を添加し、総量20 μ lで42°C1時間反応させた。反応液をフェノール抽出後、エタノール沈殿を行ない、ペレットを50mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)、100mM NaCl、10mM $MgCl_2$ 、1mM ジチオスレイトール溶液に溶解した。これにEcoRI 100単位を添加し、総量20 μ lで37°C1時間反応させた。反応液をフェノール抽出後、エタノール沈殿を行ない、ペレットを20mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)、100mM KCl、4mM $MgCl_2$ 、10mM $(NH_4)_2SO_4$ 、50 μ g/ml 牛血清アルブミン溶液に溶解した。これに大腸菌DNAリガーゼ 60単位を添加し、16°C16時間反応させた。反応液に2mM dNTP 2 μ l、大腸菌DNAポリメラーゼI 4単位、大腸菌RNaseH 0.1単位を添加し、12°C1時間ついで22°C1時間反応させた。

次いでcDNA合成反応液を用いて大腸菌DH12S(GIBCO-BRL社製)の形質転換を行なった。形質転換はエレクトロポレーション法によって行なった。形質転換体の一部を100 μ g/mlアンピシリン含有2xYT寒天培地上に蒔いて37°C一晚培養した。寒天上に生じた任意のコロニーを拾い100 μ g/mlアンピシリン含有2xYT培地2mlに接種して37°C2時間培養後、ヘルパーファージMK13KO7(ファルマシア社)を感染させ、さらに37°C一晚培養した。培養液を遠心して、菌体と上清に分け、菌体からはアルカリリシス法により2本鎖プラスミドDNAを、上清からは常法に従い一本鎖ファージDNAを単離した。2本鎖プラスミドDNAはEcoRIとNotIで二重消化した後、0.8%アガロースゲル電気泳動を行ないcDNAインサートの大きさを求めた。一方一本鎖ファージDNAは、蛍光色素で標識したM13ユニバーサルプライマーとTaqポリメラーゼ(アプライドバイオシステムズ社製キット)を用いてシーケンス反応を行なった後、蛍光DNAシーケンサー(アプライドバイオシステムズ社)にかけてcDNAの5'末端約400bpの塩基配列を決定した。配列データはホモ・プロテインcDNAバンクデータベースとしてファイル化した。

cDNAクローニング

上記cDNAライブラリーから任意に選択したクローンの塩基配列決定を行ない、得られた塩基配列を3フレームのアミノ酸配列に変換した後、これらの配列でプロテインデータベースを検索した。解析ソフトウェアはGENETYX-MAC(ソフトウェア開発社製)を用いた。その結果、クローンHP01049がコードしている蛋白質は、ラットガレクチン-4とアミノ酸配列レベルで類似性を有していることが判明した。

このクローンの構造を図1に示す。cDNAインサートの全塩基配列を決定したところ、56bpの5' 非翻訳領域、972bpのオープンリーディングフレーム、85bpの3' 非翻訳領域、37bpのポリ(A)テールからなる構造を有していた(配列番号3)。オープンリーディングフレームは323アミノ酸残基からなる蛋白質をコードしており、この配列を用いてプロテインデータベースを検索したところ、全領域にわたってラットガレクチン-4のアミノ酸配列と76.3%という高い類似性を有していた。表1に、本発明のヒトガレクチン-4様蛋白質(HS)とラットガレクチン-4(RN)のアミノ酸配列の比較を示す。-(マイナス)はギャップを、*(アスタリスク)は本発明の蛋白質と同一アミノ酸残基を、.(ドット)は本発明の蛋白質と類似アミノ酸残基をそれぞれ表す。

10 表1

	HS	MAYVPAPGYQPTYNPTLPYYQPIPGGLNVGMSVYIQGVASEHMKRFFVNFVVGQDPGSDV
		*****.*****.*****.*****.*...*.** ***.*****.**.*
	RN	MAYVPAPGYQPTYNPTLPYKRPIPGGLSVGMSIYIQGIAKDNMRRFHVNFVAVGQDEGADI
15	HS	AFHFNPRFDGWDKVVFNTLQGGKWGSEERKRSMPPFKKGAAFELVFIVLAEHYKVNVNGNP
		*****.*****.*.*.***.*.*.*****.** *****.*..*****.*
	RN	AFHFNPRFDGWDKVVFNTMQSGQWGKEEKKKSMPFQKGHHFELVFMVMSEHYKVNVNGTP
	HS	FYEYGHRLPLQMVTHLQVDGDLQLQSINFIGGQPLRPQ--GPPMMPPYPGPGHCHQQLNS
		*****.*****.*****.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*.*
20	RN	FYEYGHRLPLQMVTHLQVDGDLELQSINFLGGQPAASQYPGTMTIPAYPSAGYNPPQMNS
	HS	LPTMEGPPTFNPPVPYFGRLLQGGTLARRTIIKGYVPPTGKSFAINFKVGSSGDIALHIN
		.*.*.*****.* *****.*****.*.*.*.*****.*****.*.*
	RN	LPVMAGPPIFNPPVPYVGTLLQGGTLARRTIIKGYVLPYAKNLINFKVGSTGDIAFHNN
	HS	PRMGNGTVVRNSLLNGSWGSEEEKITHNPFPGQFFDLSIRCGLDLRFKVVYANGQHLFDFA
25		**.*. *****.*****.*.*.*****.*****.*****.*****.*****.
	RN	PRIGD-CVVRNSYMNGSWGSEERKIPYNPFGAGQFFDLSIRCGTDRFKVFANGQHLFDFA
	HS	HRLSAFQRVDLTLEIQGDVTLQSYVQI
		.*.***.*.*.*****.*.*.*****.*.*.*****.*.*.*****.*.*
30	RN	HRFQAFQRVDMLEIKGDITLSYVQI

なお得られたcDNAの配列を用いて塩基配列データベースGenBank™/EMBL/DDBJ
を検索した結果、ESTデータベースの中に配列番号3で表される本発明のcDNAの3'
非翻訳領域(1022番目から1113番目)と部分的に一致するcDNAの部分配列(Accession
No. D25577)が登録されていることがわかった。ただし、部分配列が一致するから
5 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995
 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995
 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995
 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995
 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995
 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995
 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995
 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995
 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995
 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995
 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 10135 10140 10145 10150 10155 10160 10165 10170 10175 10180 10185 10190 10195 10200 10205 10210 10215 10220 10225 10230 10235 10240 10245 10250 10255 10260 10265 10270 10275 10280 10285 10290 10295 10300 10305 10310 10315 10320 10325 10330 10335 10340 10345 10350 10355 10360 10365 10370 10375 10380 10385 10390 10395 10400 10405 10410 10415 10420 10425 10430 10435 10440 10445 10450 10455 10460 10465 10470 10475 10480 10485 10490 10495 10500 10505 10510 10515 10520 10525 10530 10535 10540 10545 10550 10555 10560 10565 10570 10575 10580 10585 10590 10595 10600 10605 10610 10615 10620 10625 10630 10635 10640 10645 10650 10655 10660 10665 10670 10675 10680 10685 10690 10695 10700 10705 10710 10715 10720 10725 10730 10735 10740 10745 10750 10755 10760 10765 10770 10775 10780 10785 10790 10795 10800 10805 10810 10815 10820 10825 10830 10835 10840 10845 10850 10855 10860 10865 10870 10875 10880 10885 10890 10895 10900 10905 10910 10915 10920 10925 10930 10935 10940 10945 10950 10955 10960 10965 10970 10975 10980 10985 10990 10995
 11000 11005 11010 11015 11020 11025 11030 11035 11040 11045 11050 11055 11060 11065 11070 11075 11080 11085 11090 11095 11100 11105 11110 11115 11120 11125 11130 11135 11140 11145 11150 11155 11160 11165 11170 11175 11180 11185 11190 11195 11200 11205 11210 11215 11220 11225 11230 11235 11240 11245 11250 11255 11260 11265 11270 11275 11280 11285 11290 11295 11300 11305 11310 11315 11320 11325 11330 11335 11340 11345 11350 11355 11360 11365 11370 11375 11380 11385 11390 11395 11400 11405 11410 11415 11420 11425 11430 11435 11440 11445 11450 11455 11460 11465 11470 11475 11480 11485 11490 11495 11500 11505 11510 11515 11520 11525 11530 11535 11540 11545 11550 11555 11560 11565 11570 11575 11580 11585 11590 11595 11600 11605 11610 11615 11620 11625 11630 11635 11640 11645 11650 11655 11660 11665 11670 11675 11680 11685 11690 11695 11700 11705 11710 11715 11720 11725 11730 11735 11740 11745 11750 11755 11760 1176

に攪拌した。ゲルを0.5M炭酸ナトリウム、水、0.05Mリン酸緩衝液(pH 7.0)で順次洗浄した。得られたラクトース固定化セファロース4Bゲルは、0.02%アジ化ナトリウムを含む0.05Mリン酸緩衝液(pH 7.0)中、4°Cで保存した。

5 インビトロ翻訳反応液100 μ lをセファデックスG-75にかけて、未反応の $[^{35}\text{S}]$ メチオニンを除去し、36kDaの翻訳産物を含む画分を集めた。この溶液を先に調製したラクトース固定化セファロース4Bカラム(ベッド容積4.5ml)にかけ、ラクトースカラム用カラム緩衝液(20mM トリス塩酸緩衝液、pH 7.5、2mM EDTA、150mM NaCl、4mM 2-メルカプトエタノール、0.01% Triton X-100)20mlで洗浄後、0.3Mラクトースを含むカラム緩衝液20mlで溶出した。その結果、溶出画分に36kDaの翻訳産物が含まれていることから、本発明の蛋白質はラクトース結合能を有することが示された。

大腸菌による融合蛋白質の発現

15 プラスミドpHP01049 1 μ gを、20単位のNotIで消化した後、クレノウ処理により平滑末端化を行なった。ついてPstIで消化した後、1% アガロースゲル電気泳動にかけ、1.2kbpのDNA断片をゲルから切り出した。

20 次いでpMALTM-c2(ニューイングランドバイオラボス社)1 μ gを、20単位のHindIIIで消化した後、クレノウ処理により平滑末端化を行なった。ついてPstIで消化した後、1%アガロースゲル電気泳動にかけ、6.7kbpのDNA断片をゲルから切り出した。ベクター断片とcDNA断片をライゲーションキットにより連結後、大腸菌JM109を形質転換した。形質転換体からプラスミドpMALGAL4を調製し、制限酵素切断地図により目的とする組換え体を確認した。

25 pMALGAL4/JM109の一晩培養液10mlを100 μ g/mlアンピシリン含有リッチ培地(1リットル当たりトリプトン 10g、酵母抽出物 5g、NaCl 5g、グルコース 2gを含む)500mlに懸濁し、37°Cで振盪培養し、 A_{600} が約0.5になったときにイソプロピルチオガラクトシドを1mMになるように添加した。さらに37°Cで3時間培養後、遠心によって集菌し、菌体をアミロースカラム用カラム緩衝液(10mM トリス塩酸、pH 7.4、200mM NaCl、1mM EDTA)25mlに懸濁した。この溶液を超音波処理後、遠心し、上澄をベッド容積3.5mlのアミロースカラム(ニューイングランドバイオ
30 ラボス社)にかけた。カラム体積の8倍量のカラムバッファーでカラムを洗浄後、

10mMマルトースを含むカラム緩衝液20mlでマルトース結合蛋白質/ガレクチン-4様蛋白質融合蛋白質を溶出し、10.9mgの融合蛋白質を得た。融合蛋白質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動にかけたところ、約81kDaの位置に単一のバンドが認められた。この分子量の値は、マルトース結合蛋白質/ガレクチン-4融合蛋白質の予想分子量と一致する。

融合蛋白質のラクトース結合活性測定

上記で調製した融合蛋白質を、先に調製したラクトース固定化セファロース4Bカラム(ベッド容積4.5ml)にかけ、ラクトースカラム用カラム緩衝液20mlで洗浄後、0.3Mラクトースを含むカラム緩衝液20mlで溶出した。溶出してきた蛋白質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動にかけたところ、81kDaの位置に単一のバンドが認められたことから、大腸菌で発現させて得られたマルトース結合蛋白質/ガレクチン-4融合蛋白質は、ラクトース結合活性を有することが示された。

15 大腸菌によるガレクチン-4様蛋白質の発現

プラスミドpHP01049 1 μ gを、20単位のNotIで消化した後、クレノウ処理により平滑末端化を行なった。ついでAatIIで消化した後、0.8%アガロースゲル電気泳動にかけ、約1kbpのDNA断片をゲルから切り出した。ついで、tacプロモーター、メタピロカテカーゼのSD配列、rrnBT1T2ターミネーターを有する大腸菌用発現ベクターpMPRA3(Japan Kokai Tokyo koho, Jp 02, 182186)1 μ gを20単位のAatIIとSmaIで消化した後、0.8%アガロースゲル電気泳動にかけ、約2.8kbpのDNA断片をゲルから切り出した。両者のDNA断片をライゲーションキットにより連結後、大腸菌JM109を形質転換した。形質転換体からプラスミドpMKGAL4-AatIIを調製し、制限酵素切断地図により目的とする組換え体を確認した。

25

2本のオリゴヌクレオチドプライマーPR1(5'-GGGACGTCATGGCCTATGTCCCCGCACC-3')とPR2(5'-GGCGACGTCTGAGCCCGGATCCTGCCC-3')をDNA自動合成機(アプライドバイオシステムズ社)により付属のプロトコールに従い合成した。プラスミドpHP01049をIngとプライマーPR1、PR2それぞれ100pmoleを用いて、PCRキット(宝酒造社)によりcDNAの5'側翻訳領域を増幅した。フェノール抽出、エタノール沈殿後、20単

30

位のAatII(東洋紡)で消化し、反応産物を1.5%アガロースゲル電気泳動にかけ、約190bpのDNA断片をゲルから切り出し精製した。

プラスミドpMKGAL4-AatII 1 μ gを、20単位のAatIIで消化した後、1%アガロースゲル電気泳動にかけ、3.8kbpのDNA断片をゲルから切り出した。このDNA断片と先にPCRによって調製した約190bpのDNA断片を、ライゲーションキットにより連結後、大腸菌JM109を形質転換した。形質転換体からプラスミドpMKGAL4を調製し、制限酵素切断地図により目的とする組換え体を確認した。得られたプラスミドの構造を図2に示す。

pMKGAL4/JM109の一晩培養液 10mlを100 μ g/mlアンピシリン含有LB培地100mlに懸濁し、37°Cで振盪培養し、A₆₀₀が約0.5になったときにイソプロピルチオガラクトシドを1mMになるように添加した。さらに37°Cで3時間培養後、遠心によって集菌し、菌体をラクトースカラム用カラム緩衝液25mlに懸濁した。この溶液を超音波処理後、遠心し、上澄を先に調製したラクトース固定化セファロース4Bカラム(ベッド容積4.5ml)にかけ、ラクトースカラム用カラム緩衝液20mlで洗浄後、0.3Mラクトースを含むカラム緩衝液20mlで溶出した。溶出してきた蛋白質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動にかけたところ、36kDaの位置に単一のバンドが認められた。この分子量の値は、ヒトガレクチン-4様蛋白質の予想分子量と一致する。すなわち、大腸菌で発現させたヒトガレクチン-4様蛋白質はラクトース結合活性を有することが示された。

産業上の利用可能性

本発明はガレクチン-4様蛋白質をコードするヒトcDNA、このヒトcDNAがコードする蛋白質を提供する。本発明のcDNAを用いることにより、該組換え蛋白質を大量に発現することができる。該組換え蛋白質は、医薬、特に消化管医薬として、あるいは研究用試薬、特に糖鎖研究用試薬として利用することができる。

配列番号 : 1

配列の長さ : 323

配列の型 : アミノ酸

配列の種類 : タンパク質

5 配列

	Met	Ala	Tyr	Val	Pro	Ala	Pro	Gly	Tyr	Gln	Pro	Thr	Tyr	Asn	Pro	Thr
	1				5					10					15	
	Leu	Pro	Tyr	Tyr	Gln	Pro	Ile	Pro	Gly	Gly	Leu	Asn	Val	Gly	Met	Ser
					20					25					30	
10	Val	Tyr	Ile	Gln	Gly	Val	Ala	Ser	Glu	His	Met	Lys	Arg	Phe	Phe	Val
					35					40					45	
	Asn	Phe	Val	Val	Gly	Gln	Asp	Pro	Gly	Ser	Asp	Val	Ala	Phe	His	Phe
					50					55					60	
	Asn	Pro	Arg	Phe	Asp	Gly	Trp	Asp	Lys	Val	Val	Phe	Asn	Thr	Leu	Gln
15		65				70					75				80	
	Gly	Gly	Lys	Trp	Gly	Ser	Glu	Glu	Arg	Lys	Arg	Ser	Met	Pro	Phe	Lys
					85					90					95	
	Lys	Gly	Ala	Ala	Phe	Glu	Leu	Val	Phe	Ile	Val	Leu	Ala	Glu	His	Tyr
					100					105					110	
20	Lys	Val	Val	Val	Asn	Gly	Asn	Pro	Phe	Tyr	Glu	Tyr	Gly	His	Arg	Leu
					115					120					125	
	Pro	Leu	Gln	Met	Val	Thr	His	Leu	Gln	Val	Asp	Gly	Asp	Leu	Gln	Leu
					130					135					140	
	Gln	Ser	Ile	Asn	Phe	Ile	Gly	Gly	Gln	Pro	Leu	Arg	Pro	Gln	Gly	Pro
25		145				150					155				160	
	Pro	Met	Met	Pro	Pro	Tyr	Pro	Gly	Pro	Gly	His	Cys	His	Gln	Gln	Leu
					165					170					175	
	Asn	Ser	Leu	Pro	Thr	Met	Glu	Gly	Pro	Pro	Thr	Phe	Asn	Pro	Pro	Val
					180					185					190	
30	Pro	Tyr	Phe	Gly	Arg	Leu	Gln	Gly	Gly	Leu	Thr	Ala	Arg	Arg	Thr	Ile

	195	200	205
	Ile Ile Lys Gly Tyr Val Pro Pro Thr Gly Lys Ser Phe Ala Ile Asn		
	210	215	220
	Phe Lys Val Gly Ser Ser Gly Asp Ile Ala Leu His Ile Asn Pro Arg		
5	225	230	235 240
	Met Gly Asn Gly Thr Val Val Arg Asn Ser Leu Leu Asn Gly Ser Trp		
	245	250	255
	Gly Ser Glu Glu Lys Lys Ile Thr His Asn Pro Phe Gly Pro Gly Gln		
	260	265	270
10	Phe Phe Asp Leu Ser Ile Arg Cys Gly Leu Asp Arg Phe Lys Val Tyr		
	275	280	285
	Ala Asn Gly Gln His Leu Phe Asp Phe Ala His Arg Leu Ser Ala Phe		
	290	295	300
	Gln Arg Val Asp Thr Leu Glu Ile Gln Gly Asp Val Thr Leu Ser Tyr		
15	305	310	315 320
	Val Gln Ile		

配列番号 : 2

配列の長さ : 969

20 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源 :

25 配列

ATGGCCTATG TCCCCGCACC GGGCTACCAG CCCACCTACA ACCCGACGCT GCCTTACTAC	60
CAGCCCATCC CGGGCGGGCT CAACGTGGGA ATGTCTGTTT ACATCCAAGG AGTGGCCAGC	120
GAGCACATGA AGCGGTTCTT CGTGAAC TTT GTGGTTGGGC AGGATCCGGG CTCAGACGTC	180
GCCTTCCACT TCAATCCGCG GTTTGACGGC TGGGACAAGG TGGTCTTCAA CACGTTGCAG	240
30 GGCGGGAAGT GGGGCAGCGA GGAGAGGAAG AGGAGCATGC CCTTCAAAAA GGGTGCCGCC	300

TTTGAGCTGG TCTTCATAGT CCTGGCTGAG CACTACAAGG TGGTGGTAAA TGGAAATCCC 360
TTCTATGAGT ACGGGCACCG GCTTCCCTA CAGATGGTCA CCCACCTGCA AGTGGATGGG 420
GATCTGCAAC TTCAATCAAT CAACTTCATC GGAGGCCAGC CCCTCCGGCC CCAGGGACCC 480
CCGATGATGC CACCTTACCC TGGTCCCGGA CATTGCCATC AACAGCTGAA CAGCCTGCCC 540
5 ACCATGGAAG GACCCCCAAC CTTCACCCG CCTGTGCCAT ATTTCCGGAG GCTGCAAGGA 600
GGGCTCACAG CTCGAAGAAC CATCATCATC AAGGGCTATG TGCCTCCAC AGGCAAGAGC 660
TTTGCTATCA ACTTCAAGGT GGGCTCCTCA GGGGACATAG CTCTGCACAT TAATCCCCGC 720
ATGGGCAACG GTACCGTGGT CCGGAACAGC CTTCTGAATG GCTCGTGGG ATCCGAGGAG 780
AAGAAGATCA CCCACAACC ATTTGGTCCC GGACAGTTCT TTGATCTGTC CATTGCTGT 840
10 GGCTTGGATC GCTTCAAGGT TTACGCCAAT GGCCAGCACC TCTTTGACTT TGCCATCGC 900
CTCTCGGCCT TCCAGAGGGT GGACACATTG GAAATCCAGG GTGATGTCAC CTTGTCCTAT 960
GTCCAGATC 969

配列番号 : 3

配列の長さ : 1113

15 配列の型 : 核酸

鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : cDNA to mRNA

起源 :

20 生物名 : ホモ=サピエンス

細胞の種類 : 胃癌組織

クローン名 : HP01049

配列の特徴 :

特徴を表す記号 : CDS

25 存在位置 : 57..1029

特徴を決定した方法 : E

配列

ATCTCCACT CCTGCAGCTC TTCTCACAGG ACCAGCCACT AGCGCAGCCT CGAGCG ATG 59
Met

30

1

	GCC TAT GTC CCC GCA CCG GGC TAC CAG CCC ACC TAC AAC CCG ACG CTG	107
	Ala Tyr Val Pro Ala Pro Gly Tyr Gln Pro Thr Tyr Asn Pro Thr Leu	
	5 10 15	
	CCT TAC TAC CAG CCC ATC CCG GGC GGG CTC AAC GTG GGA ATG TCT GTT	155
5	Pro Tyr Tyr Gln Pro Ile Pro Gly Gly Leu Asn Val Gly Met Ser Val	
	20 25 30	
	TAC ATC CAA GGA GTG GCC AGC GAG CAC ATG AAG CGG TTC TTC GTG AAC	203
	Tyr Ile Gln Gly Val Ala Ser Glu His Met Lys Arg Phe Phe Val Asn	
	35 40 45	
10	TTT GTG GTT GGG CAG GAT CCG GGC TCA GAC GTC GCC TTC CAC TTC AAT	251
	Phe Val Val Gly Gln Asp Pro Gly Ser Asp Val Ala Phe His Phe Asn	
	50 55 60 65	
	CCG CGG TTT GAC GGC TGG GAC AAG GTG GTC TTC AAC ACG TTG CAG GGC	299
	Pro Arg Phe Asp Gly Trp Asp Lys Val Val Phe Asn Thr Leu Gln Gly	
15	70 75 80	
	GGG AAG TGG GGC AGC GAG GAG AGG AAG AGG AGC ATG CCC TTC AAA AAG	347
	Gly Lys Trp Gly Ser Glu Glu Arg Lys Arg Ser Met Pro Phe Lys Lys	
	85 90 95	
	GGT GCC GCC TTT GAG CTG GTC TTC ATA GTC CTG GCT GAG CAC TAC AAG	395
20	Gly Ala Ala Phe Glu Leu Val Phe Ile Val Leu Ala Glu His Tyr Lys	
	100 105 110	
	GTG GTG GTA AAT GGA AAT CCC TTC TAT GAG TAC GGG CAC CGG CTT CCC	443
	Val Val Val Asn Gly Asn Pro Phe Tyr Glu Tyr Gly His Arg Leu Pro	
	115 120 125	
25	CTA CAG ATG GTC ACC CAC CTG CAA GTG GAT GGG GAT CTG CAA CTT CAA	491
	Leu Gln Met Val Thr His Leu Gln Val Asp Gly Asp Leu Gln Leu Gln	
	130 135 140 145	
	TCA ATC AAC TTC ATC GGA GGC CAG CCC CTC CGG CCC CAG GGA CCC CCG	539
	Ser Ile Asn Phe Ile Gly Gly Gln Pro Leu Arg Pro Gln Gly Pro Pro	
30	150 155 160	

	ATG ATG CCA CCT TAC CCT GGT CCC GGA CAT TGC CAT CAA CAG CTG AAC	587
	Met Met Pro Pro Tyr Pro Gly Pro Gly His Cys His Gln Gln Leu Asn	
	165 170 175	
	AGC CTG CCC ACC ATG GAA GGA CCC CCA ACC TTC AAC CCG CCT GTG CCA	635
5	Ser Leu Pro Thr Met Glu Gly Pro Pro Thr Phe Asn Pro Pro Val Pro	
	180 185 190	
	TAT TTC GGG AGG CTG CAA GGA GGG CTC ACA GCT CGA AGA ACC ATC ATC	683
	Tyr Phe Gly Arg Leu Gln Gly Gly Leu Thr Ala Arg Arg Thr Ile Ile	
	195 200 205	
10	ATC AAG GGC TAT GTG CCT CCC ACA GGC AAG AGC TTT GCT ATC AAC TTC	731
	Ile Lys Gly Tyr Val Pro Pro Thr Gly Lys Ser Phe Ala Ile Asn Phe	
	210 215 220 225	
	AAG GTG GGC TCC TCA GGG GAC ATA GCT CTG CAC ATT AAT CCC CGC ATG	779
	Lys Val Gly Ser Ser Gly Asp Ile Ala Leu His Ile Asn Pro Arg Met	
15	230 235 240	
	GGC AAC GGT ACC GTG GTC CGG AAC AGC CTT CTG AAT GGC TCG TGG GGA	827
	Gly Asn Gly Thr Val Val Arg Asn Ser Leu Leu Asn Gly Ser Trp Gly	
	245 250 255	
	TCC GAG GAG AAG AAG ATC ACC CAC AAC CCA TTT GGT CCC GGA CAG TTC	875
20	Ser Glu Glu Lys Lys Ile Thr His Asn Pro Phe Gly Pro Gly Gln Phe	
	260 265 270	
	TTT GAT CTG TCC ATT CGC TGT GGC TTG GAT CGC TTC AAG GTT TAC GCC	923
	Phe Asp Leu Ser Ile Arg Cys Gly Leu Asp Arg Phe Lys Val Tyr Ala	
	275 280 285	
25	AAT GGC CAG CAC CTC TTT GAC TTT GCC CAT CGC CTC TCG GCC TTC CAG	971
	Asn Gly Gln His Leu Phe Asp Phe Ala His Arg Leu Ser Ala Phe Gln	
	290 295 300 305	
	AGG GTG GAC ACA TTG GAA ATC CAG GGT GAT GTC ACC TTG TCC TAT GTC	1019
	Arg Val Asp Thr Leu Glu Ile Gln Gly Asp Val Thr Leu Ser Tyr Val	
30	310 315 320	

WO 97/03190

PCT/JP96/01899

CAG ATC TAATCTATTC CTGGGGCCAT AACTCATGGG AAAACAGAAT TATCC

1070

Gln Ile

OCTAGGACTC CTTTCTAAGC CCCTAATAAA ATGTCTGAGG GTG

1113

5

10

15

20

25

30

請 求 の 範 囲

1. 配列番号1で表されるアミノ酸配列を含む蛋白質。
2. 配列番号1で表されるアミノ酸配列をコードするcDNA。
- 5 3. 配列番号2で表される塩基配列を含む、請求項2記載のcDNA。
4. 配列番号3で表される塩基配列からなる、請求項3記載のcDNA。

10

15

20

25

30

Fig. 1

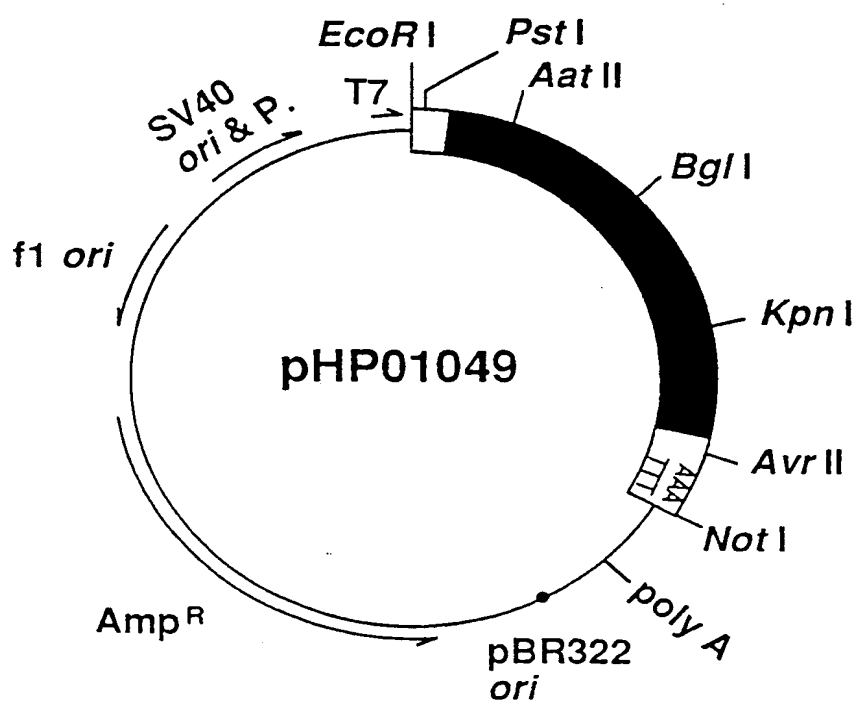
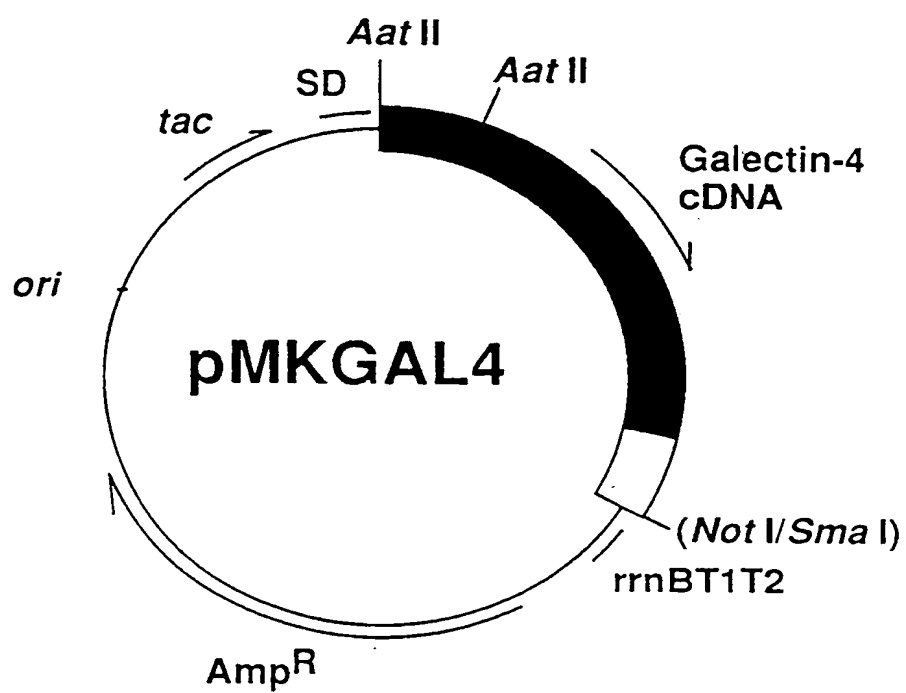


Fig. 2



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01899

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/12, C12N15/62, C12N15/63, C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/12, C12N15/62, C12N15/63, C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Yuko Oda et al. "Soluble Lactose-binding Lectin from Rat Intestine with Two Different Carbohydrate-binding Domains in the Same Peptide Chain" J. Biol. Chem. (1993) Vol. 268, No. 8, p. 5929-5939	1 - 4
Y	Huflejt M. E. et al. "Galectin-4 expression in human adenocarcinomas is correlated with a highly differentiated phenotype" Journal of Cellular Biochemistry Supplement (1995. Apr.), Vol. 57, No. 19B, p. 20	1 - 4
Y	Hu P. et al. "Isolation of human cDNA for galectin-4 the homolog of a pig lactose-binding adherens junction protein" Journal of Investigative Dermatology (1995. May) Vol. 104, No. 4, p. 644	1 - 4
Y	Tardy F. et al. "Purification and characterization of the N-terminal domain of galectin-4 from rat small intestine" FEBS	1 - 4

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
 ☐ See patent family annex.

Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
August 26, 1996 (26. 08. 96)

Date of mailing of the international search report
September 10, 1996 (10. 09. 96)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office
Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/01899

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>Letters (1995. Feb. 13) Vol. 359, p. 169-172</p> <p>Feizi T. et al. "Galectins: A family of animal beta-glactoside-binding lectins" Cell (1994), Vol. 76, No. 4, p. 597-598</p>	1 - 4

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/12, C12N15/62, C12N15/63, C12P21/02

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁸ C12N15/12, C12N15/62, C12N15/63, C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, WPI/L, BIOSIS PREVIEWS, CAS ON LINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Yuko Oda et al. "Soluble Lactose-binding Lectin from Rat Intestine with Two Different Carbohydrate-binding Domains in the Same Peptide Chain" J. Biol. Chem. (1993) 第268巻 第8号 p. 5929-5939	1-4
Y	Huflejt M.E. et al. "Galectin-4 expression in human adenocarcinomas is correlated with a highly differentiated phenotype" Journal of Cellular Biochemistry Supplement (1995. Apr.) 第57巻 第19B号 p. 20	1-4
Y	Hu P. et al. "Isolation of human cDNA for galectin-4 the homolog of a pig lactose-binding adherens junction protein" Journal of Investigative Dermatology (1995. May) 第104巻 第4号 p. 644	1-4

☒ C欄の続きにも文献が列举されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

26.08.96

国際調査報告の発送日

10.09.96

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二

4B

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Tardy F. et al. "Purification and characterization of the N-terminal domain of galectin-4 from rat small intestine" FEBS Letters (1995. Feb. 13) 第359巻 p. 169-172	1-4
A	Feizi T. et al. "Galectins: A family of animal beta-galactoside-binding lectins" Cell (1994) 第76巻 第4号 p. 597-598	1-4

THIS PAGE BLANK (USPTO)